

新種ボレリア *Borrelia miyamotoi* の 染色体地図

高 橋 幸 江

Physical and Genetic Map of the *Borrelia miyamotoi* Chromosome: Comparison with That of *Borrelia turicatae*, an Etiological Agent of Tick-Borne Relapsing Fever

Yukie Takahashi

ABSTRACT

I report the construction of physical maps of chromosomes for *Borrelia miyamotoi* HT31 and *Borrelia turicatae* (relapsing fever agent) by pulsed field gel electrophoresis of DNA fragments generated by digestion of chromosomal DNA with rare-cutting restriction endonucleases and reciprocal hybridization. The size of the *B. miyamotoi* chromosome was calculated to be approximately 925 kilobase pairs and the chromosome for *B. turicatae* was estimated to be 951 kilobase pairs. The chromosomes of *B. miyamotoi* and *B. turicatae* consisted of single linear molecules. The locations of several genes have been assigned to the chromosome maps by Southern hybridization using specific gene probes. Comparison of the genetic maps of the two species of *Borrelia* provided evidence that the gene order on the chromosomes is quite similar to that of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains and is highly conserved in the genus *Borrelia*.

【はじめに】

ボレリアはスピロヘータ目に属する微好気性のグラム陰性、無芽胞で、細長い螺旋状の特異な形態を有する運動性の細菌である⁸⁾。ボレリア属細菌はダニやシラミなどの吸血性節足動物がベクターとなり伝播される点で他属のスピロヘータと生活環を異にし、媒介ベクターの種別やその病原性の特徴からいくつかのグループに分類され、そのなかで回帰熱ボレリアとライム病ボレリアのグループが重視されている⁵⁾。

回帰熱は1867年 Obermeier によって発見された人畜共通感染症で、回帰熱ボレリア感染から約1週間の潜伏の後、頭痛、筋肉痛をともなう高熱がおこる。発熱は数日間(3～7日)続くが、病原体表層抗原に対する体液性免疫の働きによりボレリアが血液中から消失して無熱期になる。病態は発熱期と無熱期を数回繰り返しながら症状はしだいに軽解するが、特徴的な発熱と解熱の回帰はこのボレリアに特有の抗原変異によって起こることが知られている^{4, 26, 34, 35, 38)}。回帰熱ボレリアはシラミ媒介性のものとダニ媒介性のものがあるが、回帰熱ボレリアを媒介するダニは、*Ornithodoros* 属や *Argas* 属のダニ (soft-bodied argasid ticks) である⁵⁾。

一方のライム病 (Lyme disease) は、*Ixodes* 属マダニ (hard-bodied ixodid ticks) の刺咬により伝播されるボレリア感染症である²⁴⁾。本病はマダニ刺咬箇所が生じる初期の遊走性紅斑を主徴とし、これに続いて変形萎縮性の皮膚病変、関節炎や関節の変形、眼疾患、神経症状など多彩な症状を呈する多臓器疾患である⁴⁶⁾。ライム病の名は、本疾患が1970年代に米国コネチカット州のライム地方で集団発生した関節炎としてはじめて報告されたことに由来し⁴⁷⁾、1982年にはマダニの一種であるシカダニ (*Ixodes scapularis*) から病原体が分離された⁷⁾。この病原体は1984年に Johnson ら²⁵⁾ によってボレリア属の新種 *Borrelia burgdorferi* と命名記載された。その後、世界各地で多数のボレリアが分離され、新たに *Borrelia garinii*¹⁾ および *Borrelia afzelii*⁹⁾ が報告された。これに伴い、Johnson らによって命名された *B. burgdorferi* を *B. burgdorferi sensu stricto* (s.s.)、*B. garinii*、*B. afzelii* を含めたライム病関連ボレリアを総じて *B. burgdorferi sensu lato* (s.l.) と称することになった。

日本国内においても1987年以降ライム病症例の報告がなされているが、国内での症例は欧米にみられるような重篤な症状に移行することは稀で、遊走性紅斑など軽症例がほとんどである。当研究室では、旭川医科大学 寄生虫学教室、静岡県立大学 微生物学教室との共同研究により、主に日本において分離されたボレリアの分子生物学的な解析を行い、日本におけるライム病は *B. garinii* および *B. afzelii* に起因し、*Ixodes ricinus species complex* に属するシュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) が媒介ベクターとなっていることを明らかにしてきた^{18, 19, 29, 30, 52)}。

また、ライム病ボレリアはマダニ属ダニ (hard-bodied ixodid ticks) に、回帰熱ボレリ

アは *Ornithodoros* 属や *Argas* 属のダニ (soft-bodied argasid ticks) によって媒介され、これまでライム病ボレリアと回帰熱ボレリアの2つのボレリアグループは病原性だけでなく媒介ベクターの違いにより厳密に区別されてきた⁵⁾。しかしながら、近年、ライム病ボレリアの媒介ベクターであるマダニ属ダニ (シュルツェマダニ) から分離されたにもかかわらず、回帰熱ボレリア様の性状を有するボレリアが存在することを見いだした。このボレリアは、保有蛋白の解析、パルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)⁴²⁾ による保有プラスミドの分離、リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子遺伝子近傍の制限酵素切断による解析 (restriction fragment length polymorphism, RFLP, ribotype)¹⁷⁾、制限酵素切断ゲノム DNA の PFGE 分離パターンの比較解析、16S rRNA 遺伝子 (*rrs*) および鞭毛蛋白遺伝子の塩基配列比較による系統解析、DNA 相同性、G+C 含量の測定などの結果から、新種のボレリアであることが明らかになったため、*Borrelia miyamotoi* と命名し登録した²⁰⁾。この新種ボレリア *B. miyamotoi* は、従来考えられてきたボレリアとベクターの適応に合わない種であることから、ボレリアの進化や分化、あるいはベクターへの適応を明らかにしていく上で興味深い種である。

ところで、近年、PFGE により巨大 DNA 分子の直接分離分析が可能となり、染色体 DNA 解析を行うことができるようになったため、細菌の染色体の構造が明らかにされるようになった。多くの細菌の染色体が 4 mb (mega base pairs) 前後の環状構造である^{12, 27, 48, 50, 51, 54)} のに対し、ボレリア属細菌 (ライム病ボレリア) は約 1 mb の直鎖状の染色体を有していることが報告されている^{6, 14)}。ボレリアはこの直鎖状の染色体のほかにも直鎖状および環状のプラスミドを多数保有するが、これらのプラスミド分子は継代培養などにより組成、形態やサイズが変化することが知られている^{3, 41, 44)}。本稿では、新種ボレリア *B. miyamotoi* の染色体 DNA の解析を行い遺伝子地図を作成し、回帰熱ボレリア *B. turicatae* の結果と比較し考察した⁴⁹⁾。

1. 染色体物理地図

1-1 染色体 DNA の調製

染色体の解析には *B. miyamotoi* HT31 株 (= JCM 9579)²⁰⁾ および *B. turicatae* を使用した。ボレリア菌株は Barbour-Stoenner-Kelly's II (BSK II) 培地²⁾ を用い、31℃ 微好気的条件下で 1～4 週間培養した。Baril らの方法⁶⁾ に準じてゲノム DNA を包埋したアガロース片 (ゲノム DNA のプラグ) を作製し、さらに、Davidson らの方法¹³⁾ に準じてプラスミドを除去したものを精製染色体 DNA (染色体 DNA ブロック) として解析に用いた。

1-2 制限酵素による染色体 DNA の切断

染色体上の制限酵素切断点を示した物理地図を作成するにあたり、染色体 DNA のサイ

ズを測定し制限酵素切断断片の位置関係を推定するため、まず、染色体 DNA ブロックを制限酵素により切断した。ボレリア属細菌はゲノム DNA の G+C 含量が 27 ~ 32 mol%^{1, 24)} と低いと、制限酵素は染色体 DNA を適切なサイズの断片に切断するよう、6 ~ 8 塩基認識酵素の中でも認識塩基中の G, C 塩基の比率が比較的高いものを使用し、制限酵素切断後の染色体 DNA ブロックは、PFGE を用いて解析した。

各種制限酵素での切断の結果、*B. miyamotoi* の染色体 DNA は *CpoI*, *FseI*, *NotI* の切断サイトをもたなかった。また、*BbeI*, *BglII*, *BstPI*, *NaeI*, *NheI*, *PmeI*, *SpeI*, *SplI*, *XhoI* では生じる切断断片が多すぎたため解析が困難であったことから、染色体地図の作成にはこれらの制限酵素は除外した。

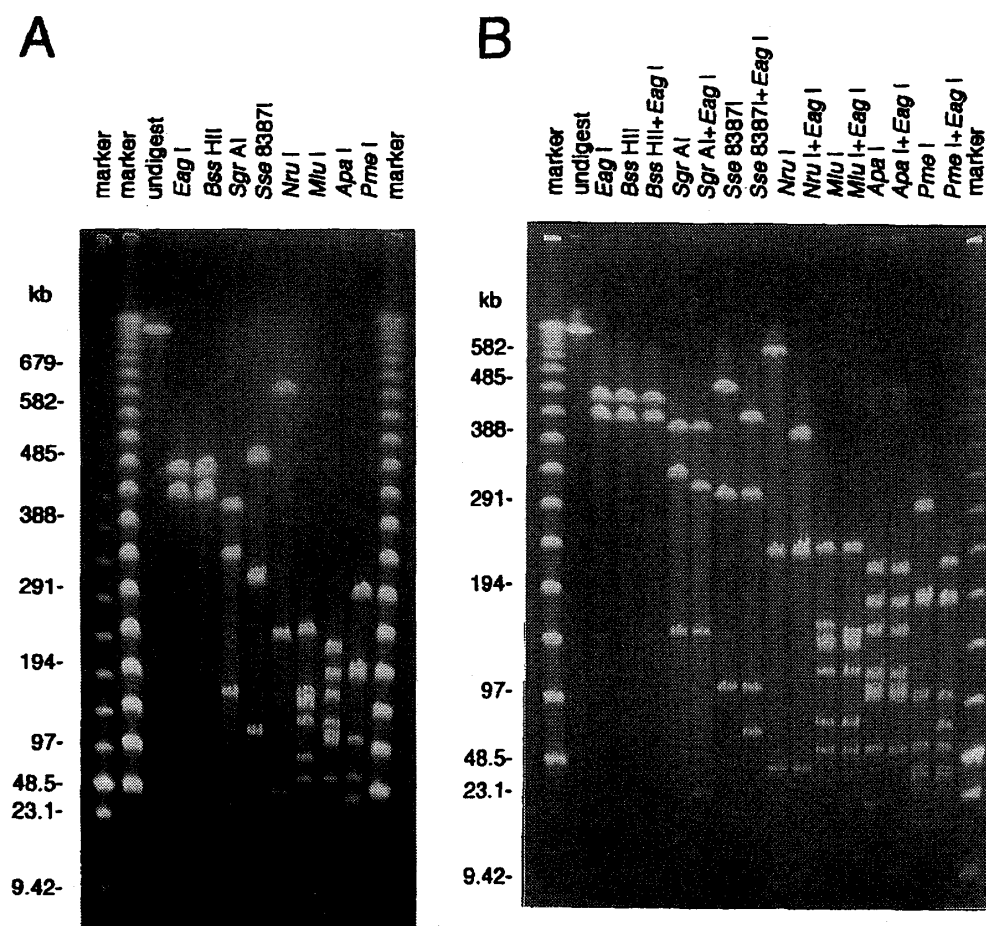


図1 *B. miyamotoi* 染色体 DNA の制限酵素切断後の PFGE による分離

各レーンには切断に用いた制限酵素を示し、undigest は制限酵素未処理の染色体 DNA を示している。

A : *B. miyamotoi* 染色体 DNA の制限酵素シングルカット後の PFGE

(1.2% agarose gel, 14°C, 150V, 20S-to-100S ramping pulse, 72hr CHEF-DR II)

B : *B. miyamotoi* 染色体 DNA の制限酵素ダブルカット後の PFGE

(1.2% agarose gel, 14°C, 150V, 5S-to-70S ramping pulse, 72hr, CHEF-DR II)

B. miyamotoi の染色体 DNA を各種制限酵素で切断（シングルカットおよびダブルカット）後 PFGE により分離した結果を図 1 に示した。*B. miyamotoi* の染色体 DNA は *Eag*I, *Bss*HII で 2 本に、*Sgr*AI, *Sse*8387I, *Nru*I で 3 本に、その他の制限酵素ではそれ以上の断片に切断された。*B. miyamotoi* の染色体 DNA を各種制限酵素で切断した際に生じる切断断片のサイズを表 1 にまとめて示した。それぞれの制限酵素により生じる DNA 断片のサイズの合計は 912 ~ 937 kb (kilo base pairs) で、染色体 DNA 全体の分子サイズは平均 924.5 kb であった。同様に *B. turicatae* について解析した結果、表 1 に示した制限酵素が染色体 DNA の解析に適切で、これらの酵素は *B. turicatae* 染色体 DNA を 3 ~ 11 の断片に切断し、全体のサイズは平均 951.3 kb であった。

また、2 種類の制限酵素の組み合わせによるダブルカットを行い、切断断片の正確なサイズを測定するとともに各断片の位置関係を推定した。

表 1. *B. miyamotoi* および *B. turicatae* 染色体 DNA の制限酵素切断断片のサイズ

Size of fragment (kbp)											
<i>B. miyamotoi</i>	fragment	<i>Eag</i> I	<i>Bss</i> HII	<i>Nru</i> I	<i>Sse</i> 8387I	<i>Sac</i> II	<i>Mlu</i> I	<i>Sma</i> I	<i>Sgr</i> AI	<i>Apa</i> I	<i>Pvu</i> I
	A	478	474	648	486	476	241	245	413	217	274
	B	440	438	242	312	280	160	200	342	183	243
	C			41	110	182	148	144	157	155	210
	D						141	126		114	116
	E						116	103		101	57
	F						71	63		66	30
	G						51	30		51	
	H									20	
	total	918	912	931	918	928	928	931	912	937	930
924.5											
Size of fragment (kbp)											
<i>B. turicatae</i>	fragment	<i>Eag</i> I	<i>Bss</i> HII	<i>Nru</i> I	<i>Sse</i> 8387I	<i>Sac</i> II	<i>Mlu</i> I	<i>Sma</i> I	<i>Sa</i> I	<i>Xho</i> I	
	A	403	311	364	408	484	347	335	250	173	
	B	290	271	207	224	266	228	199	207	125	
	C	150	168	165	113	183	114*	131	153	118	
	D	96	165	90	98		101	100	145	105	
	E		19	67	91		51	91	82	86	
	F			48	24			48*	58	85	
	G			22				10*	33	77	
	H								28	69	
	I									60	
	J									38	
	K									16	
	total	939	934	963	958	933	955	972	956	952	
951.3											

* エチジウムブロマイドによる相対的な染色強度から 2 つの同じサイズの DNA 断片が存在していることを示し、トータルサイズの算出に加算した

1-3 制限酵素切断断片によるレシプロカルハイブリダイゼーション¹⁵⁾

制限酵素切断により推定した各切断断片の相互の位置関係を確認するため、染色体 DNA を制限酵素で切断し PFGE による分離後アガロースゲルから回収した DNA 切断断片を ³²P-dCTP ラベルしたものをプローブとしてレシプロカルハイブリダイゼーションを

行った(図2)。各実験において検出されたシグナルは表2に示した。

*B. miyamotoi*の*Apa*I-E断片をプローブとした場合、*Sse*8387I, *Sac*II, *Mlu*I では2つの断片にプローブが結合したことから *Apa*I-E断片内にこの3つの制限酵素の切断点があることが明らかである。同様に *Apa*I-H断片内には*Eag*Iと*Sma*Iの切断点が存在した。また、

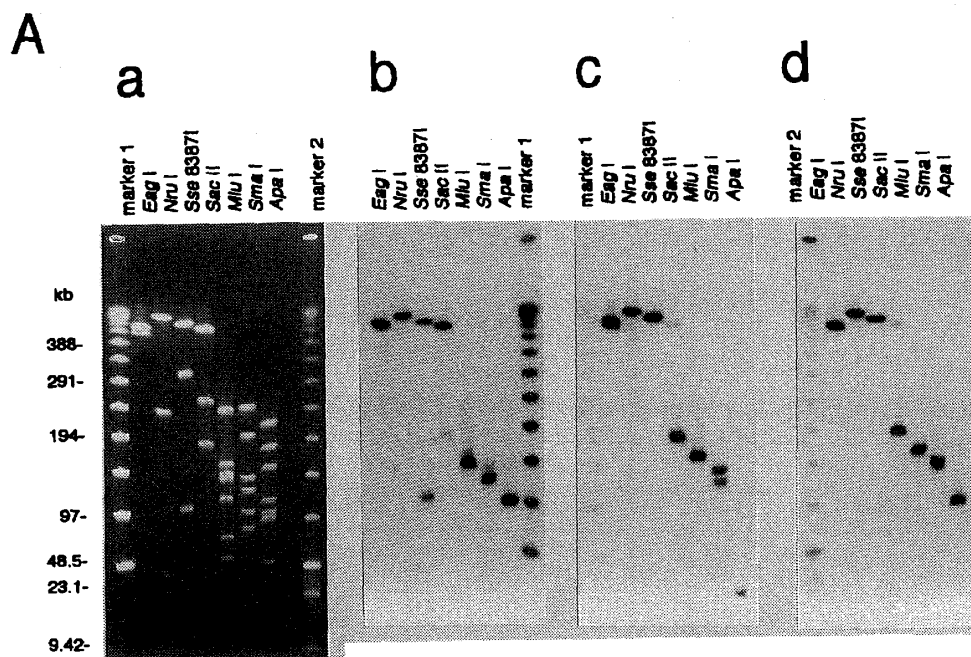


図2 ポレリア染色体DNAの制限酵素切断後のPFGEによる分離およびレシプロカルハイブリダイゼーション

A : *B. miyamotoi*染色体DNAの制限酵素切断後のPFGEおよびレシプロカルハイブリダイゼーション

a : PFGE

(1.2% agarose gel, 14°C, 150V, 2S-to-50S ramping pulse, 50hr, CHEF-DR II)

b : *Apa* I-E断片, c : *Apa* I-H断片

d : *Apa* I-F断片をプローブとしたサザン分析

B : *B. turicatae*染色体DNAの制限酵素切断後のPFGEおよびレシプロカルハイブリダイゼーション

a : PFGE

(1.2% agarose gel, 14°C, 150V, 2S-to-35S ramping pulse, 49hr, CHEF-DR II)

b : *Nru* I-A断片をプローブとしたサザン分析

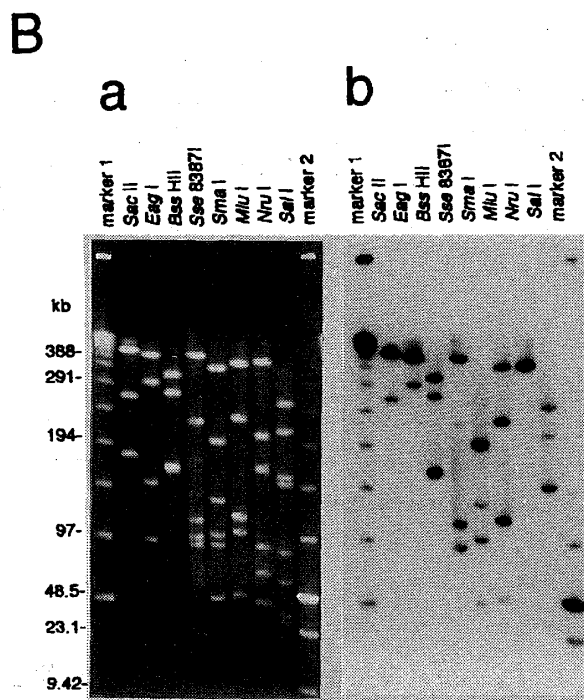


表2. *B. miyamotoi* および *B. turicatae* 染色体DNAの制限酵素切断断片によるレシプロカルハイブリダイゼーション

Probe	Restriction fragments hybridized with each ³² P-labeled probe :									
	EagI	BssHII	NruI	Sse8387I	SgrAI	SacII	MluI	SmaI	ApaI	SalI
<i>B. miyamotoi</i>										
SacII-A	A		A/B	A/B	B	A	C/D/E	A/D		
SacII-B			A/C	A		B	A/G	B/E	B/D/G	
SacII-C				A		C	A/B	C/A/E	D/F/H	
Sse8387I-A	a/B		A		A/B	a/B/C	A/B	B/C/D/E		
Sse8387I-B			A/B	B		A	D/E/F	A/F/G	A/C	
Sse8387I-C				C		A	C/E	A/D	A/E	
ApaI-A	A		A/B	B/C		A	C/E/F	A/D	A	
ApaI-B	B		A	A		B	A	B/E	B	
ApaI-C	A		B	B		A	D/F	A/F/G	C	
ApaI-D	B		A	A		B/C	A/B	C/E	D	
ApaI-E	A		A	A/C		A/C	B/C	D	E	
ApaI-F	B		A	A		C	B	C	F	
ApaI-G	B		a/C	A		B	G	B	G	
ApaI-H	A/B		A	A		C	B	C/D	H	
<i>B. turicatae</i>										
EagI-A	A	A/D	A/B	a/B/C/E/F		A/b	a/B/C/E	B/C/F		A/D/G
EagI-B	B	B/C	a/C/F/G	A		B/C	A	A/D/F		B/C/G/H
EagI-C	C	C	D/E	A/D		C	A/D	A/G		C/F
NruI-A	A/B	A/B/D	A	A/b/C/E/F		A/B	A/B/C/E	B/C/D/F		A/b/D/G/H
SacII-B	a/B	B/d	A/C/F/G	A		B	A	A/D/F		

・小文字で示した DNA 断片はシグナル強度が弱いことを表している

ApaI-E プローブが *SmaI*-D 断片のみに、*ApaI*-H プローブが *SmaI*-C および D 断片に、*ApaI*-F プローブが *SmaI*-C 断片のみに結合し、この3つのプローブが *NruI*, *SgrAI*, *Sse8387I* の同一断片に結合したことから (図2A, 表2)、*ApaI*-E, *ApaI*-H, *ApaI*-F 断片はこの順番でリンクしていることが確認できた。図2Bには *B. turicatae* の制限酵素切断後の PFGE と *NruI*-A 断片をプローブとしたレシプロカルハイブリダイゼーションの結果を示した。*NruI*-A プローブが *SacII*-A および B 断片に結合したことから、*SacII*-A と B 断片はリンクしていることが明らかである。*B. turicatae* 染色体 DNA についても *B. miyamotoi* と同様にシングルカット、ダブルカットの後、レシプロカルハイブリダイゼーションを行い物理地図の各切断点の位置関係を確認した。また、染色体 DNA の末端と推定された *B. miyamotoi* の *ApaI*-C, *ApaI*-G および *B. turicatae* の *EagI*-C の各プローブがそれぞれ反対側の末端の DNA 断片に結合しなかったことから、これらの染色体 DNA は直鎖状であることが推定された。

1-4 制限酵素切断断片の再結合実験³⁹⁾

染色体が直鎖状であることを確認するため、制限酵素切断断片の再結合実験を行った。再結合実験には、低融点アガロースゲルより回収した制限酵素切断 DNA 断片を用い、再結合分子のシグナル検出のため *B. miyamotoi* および *B. turicatae* のゲノム DNA を ³²P-dCTP ラベルしたものをプローブとしたハイブリダイゼーションを行った。

B. miyamotoi の *ApaI*-A, B, C, G の各断片を含むアガロース片をリガーゼを用いて再結合させ、PFGE により分離した。*ApaI*-A および B 断片は monomer, dimer, trimer, tetramer に相当するラダーと環状分子と推測されるシグナル (環状高分子 DNA は PFGE では泳動用ゲルのウェルに残留する³⁾) を生じたが、*ApaI*-C および G 断片は monomer と dimer に相当する分子のみ観察された。すなわち、*ApaI*-A, B 断片は両端が他分子と結合可能であるのに対して、*ApaI*-C, G 断片はその末端の一方でしか結合できないことが明らかになった。このことから、*B. miyamotoi* 染色体 DNA 分子は両末端を有する直鎖状構造で、*ApaI*-C および G 断片がその両端に位置することが確認された。

また、*B. miyamotoi* の *SmaI*-F および G 断片はダブルカットあるいはレシプロカルハイブリダイゼーションでは左右の位置関係が確定できなかったため再結合実験を行った。この場合 *SmaI* は切断により平滑末端を生じるために再結合頻度が低いので、付着末端を生じる isoschizomer である *XmaI* を用いて F および G 断片を分離したのち再結合実験を行った。その結果 (図 3)、*XmaI*-G 断片が trimer, tetramer あるいは環状分子と推測されるシグナルを生成し、*XmaI*-F 断片は dimer までしか生じなかったため、*XmaI*-F (*SmaI*-F) 断片がこの染色体 DNA の末端であり、*XmaI*-G (*SmaI*-G) はその内部の断片であると結論した。

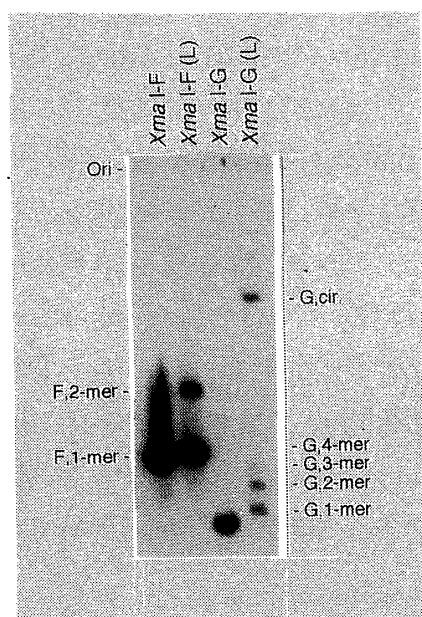


図 3. *B. miyamotoi* 染色体 DNA 切断断片の再結合実験

染色体 DNA を制限酵素 *XmaI* で切断し回収した *XmaI*-F および G 断片を再結合後、PFGE により分離し (1.2% agarose gel, 14°C, 150V, 2S-to-50S ramping pulse, 37 hr, CHEF-DR II)、*B. miyamotoi* ゲノム DNA をプローブとしたサザン分析を行った。

各レーンの *XmaI*-F, *XmaI*-G は再結合前、*XmaI*-F (L), *XmaI*-G (L) は再結合後の DNA 断片を示している。Ori は泳動開始位置、G, cir. は *XmaI*-G 断片が環状に結合したと推定されたシグナルを示した。

同様に *B. turicatae* についても *EagI* 断片の再結合実験を行い、*EagI*-C, D 断片が末端の断片であることとともに、染色体 DNA が直鎖状であることを確認した。

以上の結果より作成した物理地図を図 5 に示した。*B. miyamotoi* と *B. turicatae* では似かよった位置に切断点を有する制限酵素もあるが、物理地図はかなり異なったものであった。

2. 染色体遺伝子地図

B. miyamotoi および *B. turicatae* の染色体物理地図をもとに、表3に示した遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行い、染色体上での遺伝子の位置を決定した。サザンハイブリダイゼーションの一例を図4に示し、検出されたシグナルは表4にまとめた。以上の結果から、*B. miyamotoi*, *B. turicatae* の遺伝子地図を作成し図5に示した。

表3. 染色体DNAの遺伝子地図作成に使用した遺伝子プローブ

Probe	Size (kb)	Gene (s)	Gene product (s)	Reference
16S	1.4	<i>rrs</i>	16S rRNA	PCR product (<i>B. turicatae</i> 35-1408), unpublished data
16S-r6C	1.4	<i>rrs</i>	16S rRNA	PCR product (<i>B. miyamotoi</i> 35-1408), (20)
16S-SC	0.3	<i>rrs</i>	5' part of 16S rRNA	PCR product (<i>B. miyamotoi</i> 35-358), (20)
NP	0.2	<i>r1</i>	5' part of 23S rRNA	(17)
Sty	0.3	<i>r1</i>	3' part of 23S rRNA	(17)
EH	0.5	<i>r1</i>	5S rRNA	(21)
<i>fla-Bm</i>	1.0	<i>fla</i>	flagellin protein	PCR product (<i>B. miyamotoi</i> 1-981), (16)
<i>fla-Bt</i>	1.0	<i>fla</i>	flagellin protein	PCR product (<i>B. turicatae</i> 1-981), unpublished data
p83	3.5	<i>gyrB,A</i>	DNA gyrase subunit B and A	(32)
p84	1.1	<i>gldA</i>	glucose inhibited division protein	(32)
p822	4.5	<i>dnaN,A</i>	chromosome replication protein	(32)
p829	0.8	<i>ftsAZ</i>	cell division protein	(32)
pLA3.35	2.9	<i>dnaK</i>	heat shock protein	(53)
groEL	1.5	<i>groEL</i>	heat shock protein	PCR product (<i>B. miyamotoi</i> 92-1638), unpublished data

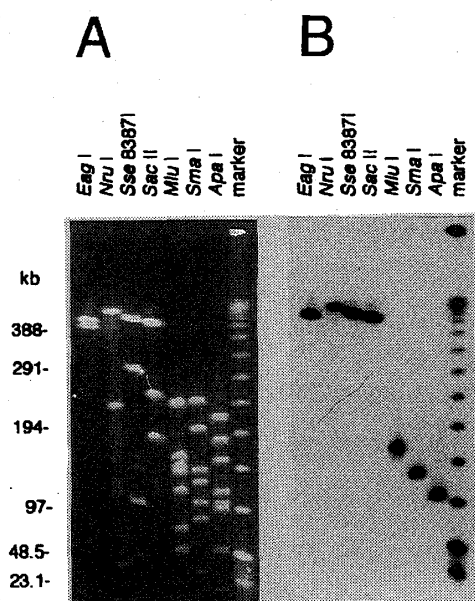


図4 *B. miyamotoi* 染色体DNAのレアクター制限酵素切断後のPFGEによる分離およびサザン分析

A: *B. miyamotoi* 染色体DNAの制限酵素切断後のPFGE

(1.2% agarose gel, 14°C, 150V, 2S-to-50S ramping pulse, 50hr, CHEF-DR II)

B: 16S rRNA遺伝子(16S-SC)をプローブとしたサザン分析

表4. *B. miyamotoi* および *B. turicatae* 染色体DNA制限酵素切断断片のサザン分析

Probe	Restriction fragments hybridized with each ³² P-labeled probe :									
	EagI	BssHII	NruI	Sse8387I	SgrAI	SacII	MluI	SmaI	ApaI	SalI
<i>B. miyamotoi</i>										
<i>rrs</i> (16S-r6C)	A	A	A	A	B	a ⁺ /C	B		EH	
<i>rrs</i> (16S-SC)	A		A	A		A	B/C ⁺	D	E	
<i>rrl</i> (NP)	A			A		C	B	D	H	
<i>rrf</i> (Sey)		B		A	B		B	C	H	
<i>rrf</i>	B		A	A	A	C	B	C		
<i>fla</i>	B		A	A	A	B	A	B		
<i>gyrBA</i>	A		A	A		A	C	D		
<i>gidA</i>				A		B	A	B	B	
<i>dnaNA</i>	A			A		A	C	D	E	
<i>ftsAZ</i>	B	B					B	C	D	
<i>dnaK</i>	A		A	C	B	A	C	D	E	
<i>groEL</i>			B	B		A	E	A	A	
<i>B. turicatae</i>										
<i>rrs</i> (16S)	A	D	A	A		a ⁺ /B	AE	F		
<i>rrs</i> (16S-SC)	A	D	A	A		A	AE	F		G
<i>rrl</i> (NP)	A	D	A	A		B	A	F		G
<i>rrf</i> (Sey)	B	B	A	A		B	A	D		G
<i>rrf</i>	B	B	A	A		B	A	D		G
<i>fla</i>	B	C	C	A		C	A	A		
<i>gyrBA</i>	A	D	A	A		A	E	F		G
<i>gidA</i>	B	B	C	A		B/C ⁺	A	F		C
<i>dnaNA</i>	A	D	A	A		A	E	F		D/G
<i>ftsAZ</i>	B	B	F	A		B	A	A		B
<i>dnaK</i>	A	D	A	C		A	C	B		D
<i>groEL</i>	A	A	A	F		A	B	C		A

* 小文字で示した DNA 断片はシグナル強度が弱いことを表している

2-1 *B. miyamotoi* 染色体 DNA の遺伝子地図

B. miyamotoi 染色体では、*rrs*, *rrl*, *rrf* がそれぞれ 1 遺伝子ずつ約 1 mb の染色体 DNA のほぼ中央に存在し、*rrs* は *rrl* / *rrf* の上流側に数 kb ~ 十数 kb 離れて位置していることが解った。一方、*dnaNA*, *gyrBA* の 2 つの遺伝子は *Sse8387I*-A と *ApaI*-E の断片が重複する領域に近接し、しかも *rrs* の上流の比較的近い位置に存在していた。細胞分裂に必須な遺伝子である *ftsAZ* は rRNA 遺伝子から約 100 kb 離れた下流に位置していた。一方、*gidA* プローブは *ftsAZ* からさらに 100 kb 離れた下流の *SmaI*-B と *ApaI*-B の重複する 150 kb 以上の大きな断片に結合した。この断片上には鞭毛蛋白をコードする遺伝子 *fla* も存在していた。熱ショック蛋白遺伝子 *dnaK* は *Sse8387I*-C と *ApaI*-E の断片が重複する領域に、*groEL* は *NruI*-B と *MluI*-E の断片が重複する領域に位置していた。

2-2 *B. turicatae* 染色体 DNA の遺伝子地図

B. turicatae の rRNA 遺伝子 (*rrs*, *rrl*, *rrf*) は *B. miyamotoi* と同様に直鎖状染色体 DNA のほぼ中央に右向きに位置していた (図⁵)。 *rrs* は *rrl* / *rrf* から約 10 kb 離れた上流に位置しており *rrs* 内には *SacII* および *MluI* の切断点があることが解った。 *gyrBA* プローブは *rrs* の上流側に隣接する断片に結合した。 *dnaNA* プローブは *gyrBA* プローブとはほぼ同じ断片に結合し、*SalI* で切断した場合に *SalI*-G だけでなくさらに上流側の断片である *SalI*-D にも結合したことから、*dnaNA* 内には *SalI* の切断点があることが推定された。

これらの結果から *B. turicatae* 染色体 DNA の中央付近の遺伝子構成は *dnaNA*-*gyrBA*-*rrs*-*rrl*-*rrf* の順であることが明らかとなった。*ftsAZ* は *rrf* の約 100 kb 下流側に、*gidA* はそのさらに 150 kb 下流に位置していた。鞭毛蛋白遺伝子 *fla* は *Bss*HII-C と *Nru*I-C 断片が重複する領域に、熱ショック蛋白遺伝子 *dnaK* は *Mlu*I-C2 と *Sse*8387I-C の断片が重複する領域に、*groEL* は *Sse*8387I-F の断片上にそれぞれ位置していた。*B. miyamotoi* と *B. turicatae* の染色体 DNA 上でのこれら遺伝子の位置および構成は高度に保存されていた。

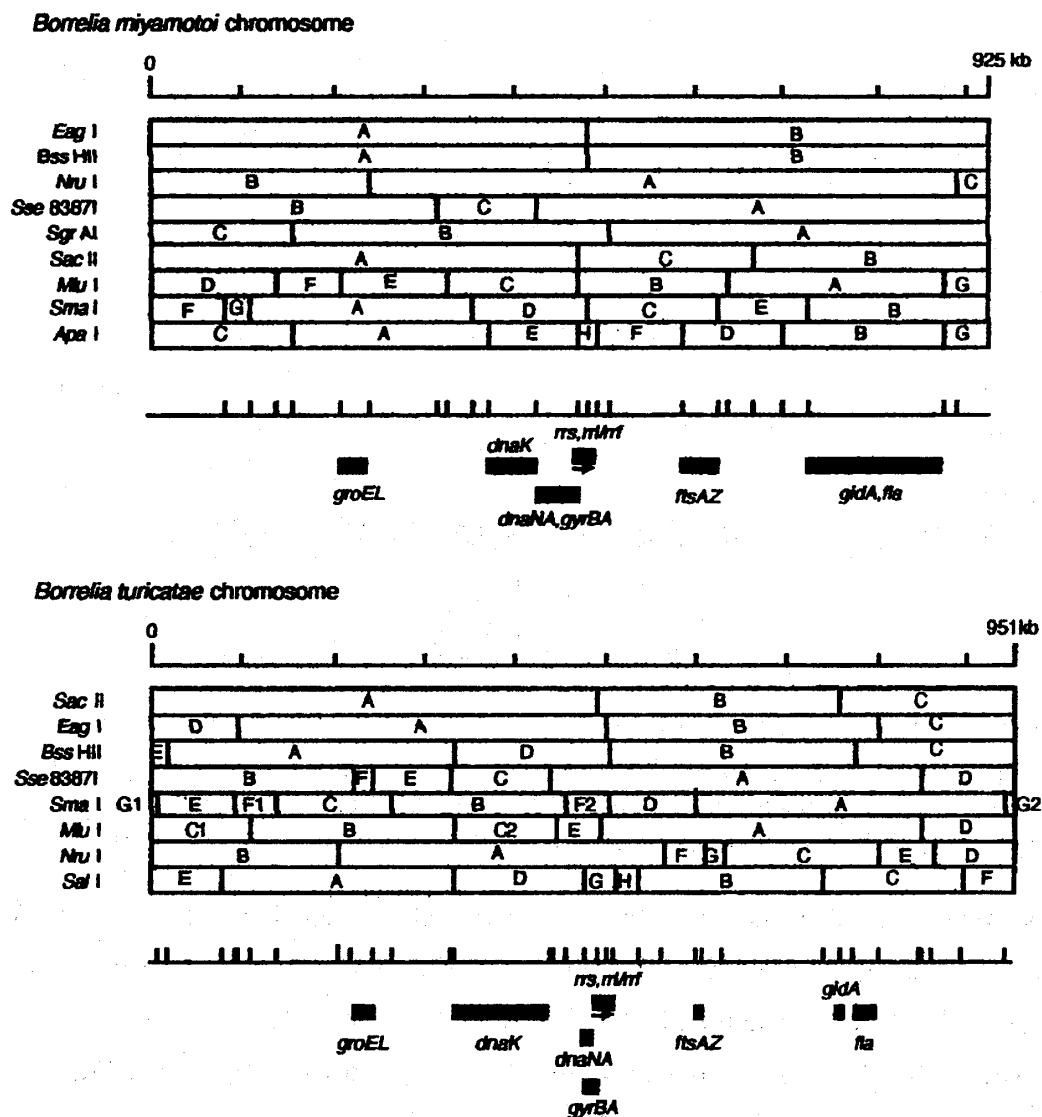


図5 *B. miyamotoi*および*B. turicatae*染色体DNAの物理地図および遺伝子地図

地図最上段のスケールはDNAの分子サイズが1目盛りあたり100kbであることを示している。物理地図中の断片は表1に記した断片名を用いた。

矢印(→)は遺伝子の方向5'→3'を示した。

3. ボレリア属細菌の染色体

ライム病ボレリアの染色体 DNA は他の細菌からは際だって小さい約 1 mb の直鎖状の DNA であることが 1989 年 Ferdows & Barbour 14) により報告されて以降、その構造および遺伝子構成について詳細な検討がなされてきた。ライム病ボレリア 3 種およびいくつかの関連するボレリアの染色体 DNA は全て 900 ~ 1,000 kb の直鎖状の分子であることが報告されている^{11, 13, 31)}。本稿で紹介した *B. miyamotoi* と *B. turicatae* がライム病ボレリアと同様に約 1 mb の直鎖状染色体を有していたことから、染色体 DNA の分子サイズと性状はボレリア属細菌全体に共通であることが解った。

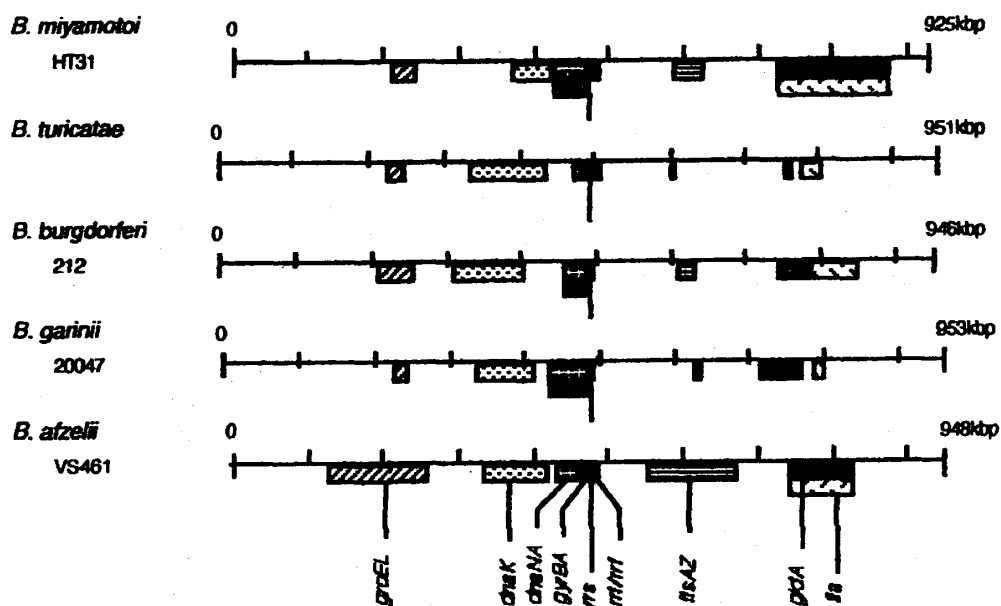


図6 ボレリア染色体遺伝子地図の比較

新種ボレリア (*B. miyamotoi* HT31)と回帰熱ボレリア(*B. turicatae*)およびライム病ボレリア(*B. burgdorferi* 212, *B. garinii* 20047, *B. afzelii* VS461)とを比較した。

5種の遺伝子地図は16S rRNA 遺伝子(*rrs*)の位置および方向を基準とし配列した。

B. miyamotoi および *B. turicatae* 染色体の遺伝子構成を、既に報告されているライム病ボレリアの遺伝子地図³¹⁾と比較した(図6)。染色体ほぼ中央の rRNA 遺伝子 *rrs* の位置と方向を基準として *B. miyamotoi* HT31 株, 回帰熱ボレリア *B. turicatae*, ライム病ボレリア *B. burgdorferi* 212 株, *B. garinii* 20047 株, *B. afzelii* VS461 株を比較した。rRNA 遺伝子構成においてライム病ボレリアの3種には *rrl* / *rrf* の繰り返しが存在するが、回帰熱ボレリアのグループの *B. miyamotoi* と *B. turicatae* では3つの rRNA 遺伝子が1コピーずつであるという点を除いて5種のボレリアに明確な差は認められず、ボレリア属細菌の遺伝子構成は種を超えて高度に保存されていた。このことから、ライム病ボレリアと回帰熱ボレリアは共通の祖先からの分化、進化によりそれぞれの媒介ベクターに適応することに

よって派生したグループであり、分化した後に染色体遺伝子の再構成などの大規模な遺伝子組み換えは起こっていないと推定できる。

通常、環状染色体は複製起点 (*ori*) から双方向に複製が進むとされているが^{23, 45)}、大腸菌をはじめ多くの細菌で *ori* の近傍に位置している *dnaNA*, *gyrBA* がボレリアの直鎖状染色体のほぼ中央に位置している。さらに、*B. burgdorferi* では染色体 DNA の中央領域の塩基配列の決定により *dnaNA* と *gyrBA* が逆向きに位置することが報告されている^{32, 33)} ことから、ボレリアの染色体は中央の *dnaNA*, *gyrBA* の付近から両側の末端に向かって複製されると推測されている。しかしながら、大腸菌などでは *dnaNA*, *gyrBA* と同じく *ori* の近傍に位置する *gidA* が、ボレリア属細菌では *dnaNA*-*gyrBA* から約 250 kb 離れた位置に存在するため^{10, 31, 32)}、ボレリア染色体の複製機構の解明には複製開始点の決定や染色体細部にわたる遺伝子の解析などが必要である。

ところで、ボレリア属細菌のゲノムは染色体 DNA と複数のプラスミド DNA から構成されており、その分子比率はほぼ 1:1 である²²⁾。ボレリアの保有するプラスミド DNA 分子のゲノム全体に占める割合は他の細菌に比べ極めて高く、低継代の病原性 B31 株ではプラスミドのゲノム占有率が 17 % にも及ぶことが報告されている^{28, 37)}。このゲノム占有率の高さとプラスミド上に細胞の生存に必須な遺伝子が存在する^{4, 34, 36, 40)} ことから、現在ではボレリアのプラスミドは文節染色体あるいは mini-chromosome とすべきであると考えられている。一方、染色体 DNA の遺伝子構成が高度に保存されているのに対し、プラスミド DNA プロファイルは継代培養や動物への接種により変動し^{3, 41, 44)}、その構造、組成は多様で変化が著しい。ボレリアの染色体 DNA とプラスミド DNA はともにその分子上に細菌の生育に必須な遺伝子を有するが、染色体 DNA 上に存在する遺伝子が通常 house keeping 遺伝子と呼ばれるものであるのに対し、プラスミド DNA には菌体外膜を構成する蛋白 (Vmp, Osp) の遺伝子が存在している。この Vmp および Osp は宿主の感染防御機構に対する抗原変異の主体をなすものであるために、その遺伝子は多様であることは必然であるのかも知れない。これらのことから、ボレリアはその進化の過程で house keeping 遺伝子を高度に保存された染色体 DNA 上に残し、環境への適応に重要な遺伝子 (*vmp*, *osp* など) をプラスミド上へと移行したのではないかと推測される。

【おわりに】

本稿では、新種ボレリア *B. miyamotoi* および回帰熱ボレリア *B. turicatae* 染色体 DNA の解析の結果、両種ボレリアの染色体がそれぞれ 924.5 kb, 951.3kb の直鎖状の分子であること。さらにライム病ボレリアとこの 2 種のボレリアの遺伝子地図の比較から、ボレリア属細菌の染色体上の遺伝子構成が種を超えて高度に保存されていることを紹介した。

ボレリア属細菌は生活環の中に媒介ベクターや保菌動物を含み生態が複雑である。この

ボレリアの分子生物学や生態を研究していくことは生物の進化のみならず、他生物とのかかわり、さらに生物の適応放散を理解する上で興味深いものであると同時に、ライム病あるいは回帰熱といったボレリア感染症における病原因子の遺伝子レベルでの解析、治療への応用などを含めたボレリア属細菌の分子生物学的解析の発展に寄与するものと考えられる。

参考文献

- 1) Baranton G, Postic D, Girons I, Boerlin P, Piffaretti J, Piffaretti C, Assous M, and Grimont PAD. 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu strict, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS116 associated with Lyme borreliosis. Int. J. Syst. Bacteriol. **42**:37-383.
- 2) Barbour AG. 1984. Immunochemical analysis of Lyme disease spirochetes. Yale J. Biol. Med. **57**:581-586.
- 3) Barbour AG. 1988. Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. J. Clin. Microbiol. **26**:475-478.
- 4) Barbour AG. 1993. Linear DNA of *Borrelia* species and antigenic variation. Trends. Microbiol. **1**:236-239.
- 5) Barbour AG, and Hayes SF. 1986. Biology of *Borrelia* species. Microbiol. Rev. **50**:381-400.
- 6) Baril C, Richaud C, Baranton G, and Saint Girons I. 1989. Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. Res. Microbiol. **140**:507-516.
- 7) Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, and Davis JP. 1982. Lyme disease - a tick-borne spirochetosis ? Science. **216**:1317-1319.
- 8) Canale-Parola E. 1984. Family I. *Spirochaetaceae* Swellengrebel 1907, 581AL. In N. R. Krieg and J. G. Holt (Eds.) Bery's manual of systematic bacteriologypp. (38-39). Baltimore: The Williams and Wilkins Co..
- 9) Canica MM, Nato F, du Merle L, Mazie JC, Baranton G, and Postic D. 1993. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme disease. Scand. J. Infect. Dis. **25**:441-448.
- 10) Casjens S, Delange M, Ley III HL, Rosa P, and Huang WM. 1995. Linear chromosomes of Lyme disease agent spirochetes: genetic diversity and conservation of gene order. J. Bacteriol. **177**:2769-2780.
- 11) Casjens S, and Hung WA. 1993. Linear chromosomal physical and genetic map of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. Mol. Microbiol. **8**:967-980.

- 12) Cole ST, and Saint Girons I. 1994. Bacterial genomics. FEMS Microbiol. Rev. **14**:139-160.
- 13) Davidson BE, MacDougall J, and Saint Girons I. 1992. Physical maps of the linear chromosome of the bacterium *Borrelia burgdorferi* 212, a causative agent of Lyme disease, and localization of rRNA genes. J. Bacteriol. **174**:3766-3774.
- 14) Ferdows MS, and Barbour AG. 1989. Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. Proc. Natl. Acad. Sci. **86**:5969-5973.
- 15) Fonstein M, and Haselkorn R. 1995. Physical mapping of bacterial genomes. J. Bacteriol. **177**: 3361-3369.
- 16) Fukunaga M, and Koreki Y. 1995. The flagellin gene of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., and its phylogenetic relationship among *Borrelia* species. FEMS Microbiol. Lett. **134**:255-258.
- 17) Fukunaga M, and Sohnaka M. 1992. Tandem repeat of the 23S and 5S ribosomal RNA genes in *Borrelia burgdorferi*, the etiological agent of Lyme disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. **183**:952-957.
- 18) Fukunaga M, Sohnaka M, Nakao M, Miyamoto K. 1993. Evaluation of genetic divergence of borrelial isolates from Lyme disease patients in Hokkaido, Japan, by rRNA gene probes. J. Clin. Microbiol. **31**:2044-2048.
- 19) Fukunaga M, Sohnaka M, and Yanagihara Y. 1993. Analysis of *Borrelia* species associated with Lyme disease by rRNA gene restriction fragment length polymorphism. J. Gen. Microbiol. **139**:1141-1146.
- 20) Fukunaga M, Takahashi Y, Tsuruta Y, Matsushita O, Ralph D, McClelland M, and Nakao M. 1995. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. Int. J. Syst. Bacteriol. **45**:804-810.
- 21) Fukunaga M, Yanagihara Y, and Sohnaka M. 1992. The 23S/5S ribosomal RNA genes (*rrl/rrf*) are separate from the 16S ribosomal RNA genes (*rrs*) in *Borrelia burgdorferi*, the aetiological agent of Lyme disease. J. Gen. Microbiol. **138**:871-877.
- 22) Hinnebusch J, and Barbour AG. 1992. Linear- and circular-plasmid copy numbers in *Borrelia burgdorferi*. J. Bacteriol. **174**:5251-5257.
- 23) Holz A, Schaefer C, Gille H, Jueterbock WR, and Messer W. 1992. Mutation in the DnaA binding sites of the replication origin of *Escherichia coli*. Mol. Gen.

- Genet. **233**:81-88.
- 24) Hyde F, and Johnson R. 1984. Genetic relationship of Lyme disease spirochetes to *Borrelia*, *Treponema* and *Leptospira* spp. J. Clin. Microbiol. **20**:151-154.
 - 25) Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, and Brenner DJ. 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov. : Etiologic agent of Lyme disease. Int. J. Syst. Bacteriol. **34**:496-497.
 - 26) Kitten T, Barrera AV, and Barbour AG. 1993. Chimeric outer membrane protein in the relapsing fever agent *Borrelia hermsii*. J. Bacteriol. **175**:2516-2522.
 - 27) Krawiec S, and Riley M. 1990. Organization of the bacterial chromosome. Microbiol. Rev. **54**:502-539.
 - 28) Marconi RT, Samuels DS, and Garon CF. 1993. Transcriptional analyses and mapping of the *ospC* gene in Lyme disease spirochetes. J. Bacteriol. **175**:926-932.
 - 29) Nakao M, Miyamoto K, and Fukunaga M. 1994. Lyme disease spirochetes in Japan: enzootic transmission cycles in birds, rodents and *Ixodes persulcatus* ticks. J. Infect. Dis. **170**:878-882.
 - 30) Nakao M, Miyamoto K, Fukunaga M, Hashimoto Y, and Takahashi H. 1994. Comparative studies on *Borrelia afzelii* isolated from a patient of Lyme disease, *Ixodes persulcatus* ticks, and Apodemus speciosus rodents in Japan. Microbiol. Immunol. **38**:413-420.
 - 31) Ojaimi C, Davidson BE, Saint Girons I, and Old IG. 1994. Conservation of gene arrangement and an unusual organization of rRNA genes in the linear chromosomes of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii* and *B. afzelii*. Microbiology **140**:2931-2940.
 - 32) Old IG, MacDougall J, Saint Girons I, and Davidson BE. 1992. Mapping of genes on the linear chromosome of the bacterium *Borrelia burgdorferi*: possible locations for its origin of replication. FEMS Microbiol. Lett. **99**:245-250.
 - 33) Old IG, Margarita D, and Saint Girons I. 1993. Unique genetic arrangement in the *dnaA* region of the *Borrelia burgdorferi* linear chromosome: nucleotide sequence of the *dnaA* gene. FEMS Microbiol. Lett. **99**: 245-250.
 - 34) Plasterk RHA, Simon MI, and Barbour AG. 1985. Transposition of structural genes to an expression sequence on a linear plasmid causes antigenic variation in *Borrelia hermsii*. Nature **318**: 257-263.
 - 35) Restrepo BI, Carter CJ, and Barbour AG. 1994. Activation of a *vmp* pseudogene in *Borrelia hermsii*: an alternate mechanism of antigenic variation

- during relapsing fever. *Mol. Microbiol.* **13**:287-299.
- 36) Restrepo BI, Kitten T, Carter CJ, Infante D, and Barbour AG. 1992. Subtelomeric expression regions of *Borrelia hermsii* linear plasmids are highly polymorphic. *Mol. Microbiol.* **6**:3299-3311.
 - 37) Sadziene A, Wilske B, Ferdows MS, and Barbour AG. 1993. The cryptic *ospC* gene of *Borrelia burgdorferi* is located on a circular plasmid. *Infect. Immun.* **61**:2192-2195.
 - 38) Saint Girons I, and Barbour AG. 1991. Antigenic variation in *Borrelia*. *Res. Microbiol.* **142**:711-717.
 - 39) Saint Girons I, Old IG, and Davidson BE. 1994. Molecular biology of the *Borrelia*, bacteria with linear replicons. *Microbiology* **140**:1803-1816.
 - 40) Samuels DS, Marconi RT, and Garon CF. 1993. Variation in the size of the *ospA*-containing linear plasmid, but not the linear chromosome, among the three *Borrelia* species associated with Lyme disease. *J. Gen. Microbiol.* **139**:2445-2449.
 - 41) Schwan TG, Burgdorfer W, and Garon CF. 1988. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of in vitro cultivation. *Infect. Immun.* **56**:1831-1836.
 - 42) Schwartz DC, Saffran W, Welsh J, Haas R, Goldenberg M, and Cantor CR. 1982. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **47**:189-195.
 - 43) Serwer X, and Hayes Y. 1987. A voltage gradient-induced arrest of circular DNA during agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis* **8**:244-246.
 - 44) Simpson WJ, Garon CF, and Schwan TG. 1990. Analysis of supercoiled circular plasmids in infectious and non-infectious *Borrelia burgdorferi*. *Microb. pathog.* **8**:109-118.
 - 45) Smith DW, Yee TW, Baird C, and Krishnapillai V. 1991. Pseudomonad replication origins: a paradigm for bacterial origin? *Mol. Microbiol.* **5**:2581-2587.
 - 46) Steere AC. 1989. Lyme disease. *New Engl. J. Med.* **321**:586-596.
 - 47) Steere AC, Malawista SE, Snyder DR, Shope RE, Andiman WA, and Steele FM. 1977. An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum.* **20**:7-17.
 - 48) Tabata K, and Hoshino T. 1996. Mapping of 61 genes on the refined physical map of the chromosome of *Thermus thermophilus* HB27 and comparison of genome organization with that of *T. thermophilus* HB8. *Microbiol.* **142**:401-410.
 - 49) Takahashi Y, and Fukunaga M. 1996. Physical mapping of the *Borrelia*

- miyamotoi* HT31 chromosome in comparison with that of *Borrelia turicatae*, an etiological agent of tick-borne relapsing fever. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 3:533-540.
- 50) Taylor DE, Eaton M, Yan W, and Chang N. 1992. Genome map of *Campylobacter Jejuni* and *Campylobacter coli*. J. Bacteriol. 174:2332-2337.
- 51) Tulloch DL, Finch LR, Hillier AJ, and Davidson BE. 1991. Physical map of the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DL11 and localization of six putative rRNA operons. J. Bacteriol. 173:2768-2775.
- 52) Uchikawa K, Muramatsu K, Miyamoto K, and Nakao M. 1991. An extensive prevalence of *Borrelia burgdorferi*, the etiological agent of Lyme borreliosis, in Nagano Prefecture, Japan. Jpn. Sanit. Zool. 42:293-299.
- 53) Wallich R, Helmes C, Schaible E, Lobet Y, Moter SE, Kramer MD, and Simon MM. 1992. Evaluation of genetic divergence among *Borrelia burgdorferi* isolates by use of OspA, fla, HSP60, and HSP70 gene probes. Infect. Immun. 60:4856-4866.
- 54) Wilkinson SR, and Young M. 1995. Physical map of the *Clostridium beijerinckii* (formerly *Clostridium acetobutylicum*) NCIMB 8052 chromosome. J. Bacteriol. 177:439-448.